

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/14882 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/566, 33/50, 33/15 (74) 代理人: 志村光春(SHIMURA, Mitsuharu); 〒150-0031 東京都渋谷区桜丘町9-3 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05615
- (22) 国際出願日: 2000年8月22日 (22.08.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ビー・エム・エル (BML, INC.) [JP/JP]; 〒151-0051 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平井博之 (HIRAI, Hiroyuki) [JP/JP], 小川一行 (OGAWA, Kazuyuki) [JP/JP], 永田欽也 (NAGATA, Kinya) [JP/JP], 高野昇一 (TAKANO, Syoichi) [JP/JP]; 〒350-1101 埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社 ビー・エム・エル 総合研究所内 Saitama (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING PROPERTIES OF SUBSTANCE TO PROSTAGLANDIN D RECEPTORS

(54) 発明の名称: 物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質の同定方法

(57) Abstract: A method of identifying a substance which acts on a newly found second human prostaglandin D2 receptor subtype different from the DP receptor and is useful in treating or preventing various diseases. This method comprises examining the effect of the test substance on the human prostaglandin D receptor in correlation with its effect on the human CRTH2 to thereby identify the properties of the test substance to the human prostaglandin D receptors.

(57) 要約:

本発明は、DPレセプター以外の、第2のヒトプロスタグランジンD2受容体サブタイプを見出し、種々の疾患の治療や予防に有用な、この受容体サブタイプに対して作用する物質の同定法を提供することを課題とする。本発明はこの課題を解決するために、被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に、同物質のヒトCRTH2への作用を関連付けることにより、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質を同定する同定方法を提供する。

明細書

物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質の同定方法

技術分野

本発明は、特定の性質を有する物質の同定方法に関する発明である。

背景技術

プロスタグランジン、トロンボキサン、およびロイコトリエンのようなプロスタノイドは、アラキドン酸の酸化代謝物のひとつのファミリーであり、生体内で局所ホメオスタシスを維持するために重要な働きをしている。このプロスタノイドの一員である、プロスタグランジンD₂ (PGD₂) は、哺乳動物では、脳、心臓、脾臓、肺、腎臓、骨髄、胃、腸、皮膚、子宮、および眼を含む多数の臓器で合成され、種々の生理活性を発揮していることが知られている (Ujihara, M. ら、Arch. Biochem. Biophys., 260: 521-531, 1988; Ito, S. ら、Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 37: 219-234, 1989 およびその中の引用文献)。例えば、PGD₂ は、中枢神経系においては睡眠導入、体温調節、嗅覚機能、ホルモン放出、炎症、および無痛覚などに関与していると考えられている (Negishi, M. ら、Prog. Lipid Res., 32: 417-434, 1993 およびその中の引用文献)。また、PGD₂ は、血小板凝集を抑制する一方で、血管、胃、腸および子宮の平滑筋を弛緩させる作用を有することが知られている (Giles, H. ら、Prostaglandins, 35: 277-300, 1988 およびその中の引用文献)。さらに、PGD₂ は、免疫反応で重要な役割を果たしている肥満細胞から放出される主要なプロスタノイドであり、気管支平滑筋の収縮や好酸球の炎症局所への遊走、肥満細胞や好酸球、好塩基球からの炎症性メディエーターの遊離促進などの作用を通して、アレルギー性鼻炎や気管支喘息などのアレルギー疾患の病態形成に関与していることも知られている (Negishi, M. ら、Prog. Lipid Res., 32: 417-432, 1993 およびその中の引用文献)。さらに、PGD₂ には、局所投与された場合眼圧を下げる作用があることが示されている (Woodward, D.F. ら、Eur. J. Pharma

col., 230: 327-333, 1993)。

これらの知見から、 PGD_2 受容体に対して何らかの作用が認められる物質、例えば、 PGD_2 受容体の選択的なモジュレーター（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）は、 PGD_2 が関与する種々の疾患の治療薬になることが期待されている。例えば、その生理作用から予想されるように、鎮静・睡眠薬、沈痛薬、血圧調節薬、血小板凝集抑制薬、循環器用薬、胃・腸の運動抑制薬、抗胃潰瘍薬、アレルギー治療薬、抗炎症薬、緑内障の予防・治療薬などとしての幅広い用途が期待される。

現在では、 PGD_2 は、特異的な受容体を介してその作用を発揮していることが明らかになっている (Coleman, R. ら、Pharmacol. Rev., 46: 205-229, 1994)。しかしながら、 PGD_2 とその受容体との反応には、種特異性があり、動物組織あるいは動物モデルを用いての薬剤のスクリーニングや薬効の評価には限界があることも分かっている (Narumiya, S. ら、Br. J. Pharmacol., 85: 367-375, 1985)。

また、薬理学的解析により、ヒトや動物では、 PGD_2 受容体には少なくとも2種のサブタイプが存在し、 PGD_2 の多様な薬理作用を仲介していることがしばしば示唆されている (Woodward, D.F. ら、Eur. J. Pharmacol., 230: 327-333, 1993; Fernandes, B. ら、Eur. J. Pharmacol., 283: 73-81, 1995)。例えば、ヒト子宮平滑筋では、 PGD_2 による収縮作用を仲介する受容体と、それとは逆に、弛緩作用を仲介する受容体の、2種の PGD_2 受容体サブタイプの存在が示唆されている (Fernandes, B. ら、Eur. J. Pharmacol., 283: 73-81, 1995)。従って、 PGD_2 の多様な作用のうち、病態の改善や予防につながる特定の作用のみをモジュレートする薬剤を開発する上においては、ヒトの各臓器における PGD_2 受容体サブタイプの分布状態を把握することと、この受容体サブタイプをコードするcDNAを単離することが必須であった。

最近になり、ようやくひとつの PGD_2 受容体サブタイプと考えられる遺伝子がクローニングされた（以下、Dプレセプターともいう）(Boie, Y. ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995; 特表平10-507930号公報)。

現在、このDプレセプターが、 PGD_2 の示す多様な生理活性のうち、具体的

に、どの生理活性に関与しているのかが解析されている。その結果、例えば、ラットの脳において、D P レセプターの発現解析を行った結果、D P レセプターの分布と P G D₂ の睡眠誘導感受性領域とが一致しないとの報告がなされている

(Gerashchenko, D. ら、J. Neurochem., 71: 937-945, 1998)。つまり、D P レセプター以外の P G D₂ 受容体の存在が示唆されており、その存在の確認と機能の同定が求められている。

本発明が解決しようとする課題は、D P レセプター以外の、第 2 のヒト P G D₂ 受容体サブタイプを見出し、種々の疾患の治療や予防に有用な、この第 2 の P G D₂ 受容体サブタイプに対して作用する物質、例えば、選択的なモジュレーター（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）の同定法を提供することにある。

発明の開示

本発明者は、本発明者らがヒトリンパ球より遺伝子クローニングした、G 蛋白質共役受容体様蛋白質ヒト C R T H 2（以下、ヒト C R T H 2 とともいう）[Nagata, K. ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 および再公表特許 W O 9 7 / 4 6 6 7 7（この特許公報では、ヒト C R T H 2 を B 1 9 と称している）]について、その生理的リガンドを探索する過程で、偶然にもヒト C R T H 2 が P G D₂ と選択的に反応することを見出し、さらに、ヒト C R T H 2 と D P レセプターを比較した結果、両者間で、P G D₂ 類似物質に対する反応性に違いがあることを見出した。また、ある種の化合物（例えば、ヒト C R T H 2 抗体）は、D P レセプターに対してなんら影響を及ぼすことなしに、ヒト C R T H 2 に対して選択的なアンタゴニスト活性を発揮し得ることを、本発明者は確認した。

このように、当初は、P G D₂ とは全く無関係とも思われたヒト C R T H 2 が、驚くべきことに、目的とする第 2 のヒト P G D₂ 受容体サブタイプであると結論するに至った。

本発明は、このヒト C R T H 2 の P G D₂ 受容体サブタイプとしての性質を用いて、ヒト P G D₂ に関連する有用な物質を見出し得る、物質の同定方法に関する発明である。

すなわち、本発明者は、本願において、被験物質のヒトプロスタグランジン D

受容体への作用（例えば、同受容体において選択的なモジュレーター作用）に、同物質のヒトC R T H 2 への作用を関連付けることにより、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質を同定する、被験物質の同定方法（以下、本発明同定方法ともいう）を提供する。

本発明において、「モジュレーター作用」とは、対象となるプロスタグランジン受容体の働きに及ぼす何らかの作用のことを意味するものであり、代表的には、前記受容体の働きの阻害作用（典型的には、アンタゴニストが示す作用である）や、同促進作用（典型的には、アゴニストが示す作用である）等が挙げられるが、これらの作用に限定されるものではない。

図面の簡単な説明

第1図は、ヒトC R T H 2（K B 8）およびD P レセプター（K D 3 6）発現細胞の $[^3\text{H}]$ P G D₂ 結合能を実施例3の方法で行った結果を示す図面であり、第2図は、ヒトC R T H 2（K B 8）およびD P レセプター（K D 3 6）発現細胞のP G D₂ に対する反応を実施例4に示した細胞内カルシウムアッセイで測定した結果を示す図面であり、第3図は、ヒトC R T H 2 およびD P レセプターのリガンド選択性を実施例5に示した方法で測定した結果を示す図面であり、そして、第4図は、ヒトC R T H 2 の選択的アゴニストによる、細胞表面からのダウンモジュレーションを実施例6に示した方法で測定した結果を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

A. ヒトC H T H 2 について

本発明同定方法は、既知のヒト蛋白質であるヒトC R T H 2 が、D P レセプター以外の、第2のヒトP G D₂ 受容体サブタイプとして機能しているという知見に基づく発明である。

ヒトC R T H 2 は、データベースD D B J、E M B L、G e n B a n k において、「アクセッションナンバーA B 0 0 8 5 3 5」として登録された、ヒト由来の蛋白質を指し、そのc D N A の塩基配列およびそれよりコードされるアミノ酸

配列は公知であり、誰でも上記データベースあるいは出版物〔Nagata, K.ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 および再公表特許WO 97/46677（この特許公報には、「B19遺伝子」として記載されている）〕より知ることができる。

これらの公知の情報をもとに、純化したヒトCRTH2蛋白質又はその部分ペプチド、あるいはヒトCRTH2を発現する細胞、あるいはヒトCRTH2を含む細胞分画等を調製して、本発明同定方法において用いることができる。

(1) ヒトCRTH2 又はその部分ペプチドの調製について

例えば、ヒトCRTH2の部分ペプチドや全長ペプチドは、公知の方法により化学合成して得ることができる。また、より一般的には、ヒトCRTH2の全長ペプチド、あるいは一部のアミノ酸を置換、除去又は付加した改変ペプチド、あるいは部分ペプチド（これらを、ヒトCRTH2関連蛋白質と総称することもある）の、いずれかをコードするcDNAを作製し、これを適切な発現ベクターに組み込み、さらに適切な宿主細胞をこの発現ベクターで形質転換して、この形質転換体から、組換えヒトCRTH2関連蛋白質を製造することができる。

ヒトCRTH2 cDNAの、クローニングおよび組み換えは当業界周知の標準的技術を用いてなされうる。ここでいう標準的技術は、例えば、Maniatis, T.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989）に詳細に記載されている。また、公知の方法、例えば、いわゆるサイトスペシフィックミュータジェネシス（Site-Specific Mutagenesis）（Mark, D.F., ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 5662（1984））等の方法を用いて、遺伝子改変を行うことができる。

組み換えヒトCRTH2を、適切な宿主細胞に発現させるには、通常は、まず公知のヒトCRTH2 cDNAの塩基配列情報を基に、発現ベクターに、ヒトCRTH2関連蛋白質をコードするDNA（典型的には、ヒトCRTH2 cDNA）をクローニングする。例えば、ヒトCRTH2遺伝子の発現が亢進していることが報告されている組織から抽出したpoly(A)+RNAを鋳型にして、公知の方法によりRT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)法で、ヒトCRTH2 cDNAを単離することができる（"PCR Protocols, A Guide to Met

hods and Applications” Innis, M. A., 編, Academic Press, San Diego, 1990)。なお、ヒトC R T H 2 遺伝子発現が高進しているヒト組織としてはT h 2 タイプTリンパ球 (Nagata, K. ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999)、好酸球、好塩基球等を例示できる。

また、上記のごとくしてP C Rで増幅したヒトC R T H 2 c D N A断片や、化学合成したヒトC R T H 2 の塩基配列に相補的なD N AあるいはR N Aをプローブとして、例えば、上記のヒトC R T H 2 高発現組織由来のc D N Aライブラリーから、ヒトC R T H 2 c D N Aの全長を入手する伝統的な手法を採用してもよい。このような伝統的な手法は、例えばManiatis, T. ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989) に詳細に記載されている。

ヒトC R T H 2 c D N A等のヒトC R T H 2 関連蛋白質をコードするD N Aを組み込む発現用ベクターは、通常発現しようとする遺伝子の上流域にプロモーター、エンハンサー、および下流域に転写終了配列等を保有するものを用いるのが好適である。また、ヒトC R T H 2 遺伝子の発現は、直接発現系に限らず、例えば β -ガラクトシダーゼ遺伝子、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子やチオレドキシン遺伝子を利用した融合タンパク質発現系とすることもできる。

かかる遺伝子発現用ベクターとしては、例えば、宿主を大腸菌とするものとしては、p Q E, p G E X, p T 7-7, p M A L, p T r x F u s, p E T, p N T 2 6 C I I等を例示することができる。また、宿主を枯草菌とするものとしては、p P L 6 0 8, p N C 3, p S M 2 3, p K H 8 0等を例示することができる。また、宿主を酵母とするものとしては、p G T 5, p D B 2 4 8 X, p A R T 1, p R E P 1, Y E p 1 3, Y R p 7, Y C p 5 0等を例示することができる。また、宿主を哺乳動物細胞又は昆虫細胞とするものとしては、p 9 1 0 2 3, p C D M 8, p c D L-S R α 2 9 6, p B C M G S N e o, p S V 2 d h f r, p S V d h f r, p A c 3 7 3, p A c Y M 1, p R c / C M V, p R E P 4, p c D N A I等を例示することができる。

これらの遺伝子発現ベクターは、ヒトC R T H 2 関連蛋白質を発現させる目的に応じて選択することができる。例えば、大量にヒトC R T H 2 関連蛋白質を発

現させることを企図する場合には、宿主として大腸菌、枯草菌又は酵母等を選択し得る遺伝子発現ベクターを選択するのが好ましく、少量でも確実に活性を有するようにヒトC R T H 2 関連蛋白質を発現させることを企図する場合には、哺乳動物細胞や昆虫細胞を宿主として選択し得る遺伝子発現ベクターを選択するのが好ましい。なお、上記のように既存の遺伝子発現ベクターを選択することも可能であるが、目的に応じて適宜遺伝子発現ベクターを作出して、これを用いることも勿論可能である。

ヒトC R T H 2 関連蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ発現用ベクターの宿主細胞への導入及びこれによる形質転換法は、一般的な方法、例えば宿主が大腸菌や枯草菌である場合には、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を；宿主が哺乳動物細胞や昆虫細胞の場合はリン酸カルシウム法，エレクトロポレーション法又はリポソーム法等の手段により行うことができる。

このようにして得られる形質転換体を常法に従い培養することにより、所望するヒトC R T H 2 関連蛋白質が蓄積される。かかる培養に用いられる培地は、宿主細胞の性質に応じて適宜選択することができるが、例えば宿主が大腸菌である場合には、L B培地やT B培地等が、宿主が哺乳動物細胞の場合には、R P M I 1 6 4 0培地等を適宜用いることができる。

上述の手順等により得られる組換えヒトC R T H 2 関連蛋白質は、純粋なヒトC R T H 2 蛋白質として単離精製して使用することが可能である。ヒトC R T H 2 関連蛋白質の精製には公知の技術、例えば、細胞の可溶化、タンパク沈澱剤による処理、限外濾過，ゲル濾過，高速液体クロマトグラフィー，遠心分離，電気泳動，特異抗体や特異的リガンドを用いたアフィニティクロマトグラフィー，透析法等を単独で又はこれらの方法を組み合わせて用いることができる。なお、一般的なプロスタノイド受容体の精製法については、例えばUshikubi, F.ら、J. Biol. Chem., 264: 16496-16501, 1989に記載されており、この精製法に準じて精製工程を行うことができる。

(2) ヒトC R T H 2 を発現する細胞、あるいはヒトC R T H 2 を含む細胞分画等について

前述したように、組換えヒトC R T H 2 関連蛋白質を用いずに、天然のヒトC

RTH2を高発現しているヒト組織あるいはヒト細胞株等を、本発明同定方法において用いることも可能である。また、上記のヒトCRTH2関連蛋白質をコードする遺伝子による形質転換体を用いることも可能である。ただし、この場合、これらの組織や細胞株等が、ヒトCRTH2を発現すると同時に、DPレセプターや他のプロスタノイドレセプターを発現していないことが望ましい。

ヒトCRTH2発現細胞は、それ自体を、本発明同定方法において使用することができるし、それよりヒトCRTH2蛋白質を含む細胞分画（例えば、超音波破碎処理と超遠心法により得た膜成分等）を得ることもできる。

以上、(1)(2)に記載したように、純化したヒトCRTH2関連蛋白質、あるいはヒトCRTH2を発現する細胞、あるいはヒトCRTH2を含む細胞分画等（以下、これらの蛋白質、細胞、細胞分画等を総称して、ヒトCHTR2等ともいう）を調製して、これらを本発明同定方法に用いることができる。

B. 本発明同定方法の内容について

前述したように、本発明同定方法では、被験物質のヒトCHTR2等への作用が、被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に関連付けられ、この関連付けが行われる前提として、被験物質のヒトCHTR2等への作用を特定することが必要となる。

被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する作用として代表的な作用が、ヒトプロスタグランジンD受容体サブタイプにおいて選択的なモジュレーター作用である。

以下、この選択的なモジュレーター作用を中心に説明する。

既に述べたように、本発明同定方法は、ヒトCRTH2が、DPレセプター以外の、第2のヒトPGD₂受容体サブタイプとして機能しているという知見に基づく同定方法である。よって、被験物質が、ヒトCRTH2の活性に選択的なモジュレーターとして同定されれば、その被験物質が、第2のヒトPGD₂受容体に対する選択的なモジュレーターとして同定されることとなる。ヒトCRTH2の活性に選択的なモジュレーターは、前述したように、例えば、純化したヒトCRTH2蛋白質又は部分ペプチド、あるいはヒトCRTH2を発現する細胞、あるいはヒトCRTH2を含む細胞分画を用い、例えば、ヒトCRTH2に対する選

択的な結合能あるいはヒトC R T H 2の機能に対する選択的な効果などによって同定される。

上述したように、本発明同定方法では、種々の分子形態のヒトC R T H 2を使用することが可能であるが、ヒトC R T H 2の選択的なモジュレーターの活性評価にあたっては、一般的にいくつかの考慮すべき点がある。まず、P G D₂と実質的な相互作用をするのに必要なヒトC R T H 2の最小ドメインは、現在のところ不明である。従って、ヒトC R T H 2の部分ペプチドを使用するより、ヒトC R T H 2蛋白質の全長を使用した方が、現在のところは好適であるかもしれない。また、ヒトC R T H 2蛋白質の一部のアミノ酸を置換あるいは除去したヒトC R T H 2蛋白質の誘導体では、リガンド選択性が変化する可能性がある。従って、天然のヒトC R T H 2蛋白質と同一のアミノ酸配列をもったものを使用することが好適かもしれない。また、ヒト膜蛋白質として存在するヒトC R T H 2の細胞外領域には糖鎖が結合しており、その糖鎖がP G D₂と有効に相互作用するのに必要である可能性がある。従って、ヒトC R T H 2を発現させる宿主は糖鎖を付加しうる宿主細胞が好適かもしれない。この場合さらに、糖鎖の種類がヒトC R T H 2の機能に関係する可能性がある。従って、糖鎖構造に関する十分な情報が入手されるまでは、ほ乳類動物細胞を宿主細胞として使用することが好適かもしれない。勿論、ヒトC R T H 2モジュレーターの大量のスクリーニングに当たっては、上述した改変ヒトC R T H 2やヒトC R T H 2の部分ペプチド等が有利な場合があるので、目的に応じて使用するヒトC R T H 2の分子形態を選ぶことができる。

本発明同定方法によって、ヒトC R T H 2等の活性に選択的なモジュレーターを同定するに際して、その被験物質は全く限定されない。すなわち、本発明同定方法の被験物質は、天然物（生物工学的手法により製造された組換え蛋白質等を含む）、化学合成品であってもよい。また、本発明同定方法を行うに際しては、必要に応じて、公知の標識又は非標識のリガンド（例えば、ヒトP G D₂等のプロスタノイド）を用いることができる。

被験物質のヒトC H T R 2等への作用の同定方法は、特に限定されず、当業界周知のアッセイ法を用いて測定することができる。例えば、プロスタノイドの受

容体結合アッセイ法は、Boie, Y. ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995 等に記載されている。

被験物質のヒト C R T H 2 等への作用、例えば、選択的なモジュレーター作用を、被験物質のヒトプロスタグランジン D 受容体への作用に関連付ける場合、代表的な手段の一つとして、(1) 被験物質における、ヒト C R T H 2 関連蛋白質に対する結合性を指標とする手段を挙げることができる。

この手段を用いる場合、例えば、被験物質の精製ヒト C R T H 2 への結合は、表面プラズモン共鳴を測定原理とした装置 [例えばBiacore 2000 (アマシャムフェルマシア社)] で直接測定することができる (例えばBoris, J. ら、J. Biol. Chem., 272:11384-11391, 1997 に記載された方法を例示できる)。また、被験物質のヒト C R T H 2 への結合は、標識した被験物質を用いて直接試験することも可能であり、また、上述したように、標識した公知のリガンド (例えば、 $[^3\text{H}]$ 標識 P G D₂) の結合の阻害もしくは増強を指標に測定することもできる (例えば、Boie, Y. ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995 に記載された方法を例示できる)。

この手段により、被験物質に、ヒト C R T H 2 関連蛋白質に対する結合性が認められれば、被験物質が、ヒトプロスタグランジン D 2 受容体に対して、阻害作用や増強作用等の何らかの作用を及ぼすモジュレーターである可能性が高くなる。

また、上記の代表的な手段の他の態様として、(2) 被験物質における、ヒトプロスタグランジン D 受容体に対する作動性を指標とする手段を挙げることができる。

すなわち、被験物質による、in situ の状態のヒト C R T H 2 の活性化、あるいは P G D₂ によるヒト C R T H 2 の活性化に与える作用 (阻害あるいは増強) で、被験物質における、ヒトプロスタグランジン D 受容体に対する作動性を測定することができる。この場合、ヒト C R T H 2 の活性化は宿主細胞の細胞内カルシウム濃度の上昇 (例えばBoie, Y. ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995 に記載された方法を例示できる)、走化性の亢進 (例えばYokomizo, T. ら、Nature, 387: 620-624, 1997 に記載された方法を例示できる)、細胞表面のヒト C R T H 2 分子のダウンモジュレーション (例えばLuttrell, L.M. ら、Science, 2

83: 655-661, 1999に記載された方法を例示できる)などを指標にすることができる。なお、ヒトCRTH2の活性化を測定する場合に宿主として使用する哺乳類細胞株としては、K562、Jurkat、HEK293、CHOなどが例示できる。

この手段において、被験物質により、in situ の状態のヒトCRTH2のレセプター活性が増大すれば、被験物質は、ヒトプロスタグランジンD₂受容体の活性を増強する、アゴニスト等として同定され、逆に、上記のレセプター活性が減少すれば、被験物質がヒトプロスタグランジンD₂受容体の活性を減弱させる、アンタゴニスト等として同定される。

ヒトCRTH2、すなわち第2のヒトPGD₂受容体に選択的なモジュレーターは、PGD₂が関与する種々の疾患状態のうち、第2のヒトPGD₂受容体が関与する疾患状態の治療および予防に有用である。第2のヒトPGD₂受容体が関与する疾患状態はまだ十分特定されていないが、上記モジュレーターは、PGD₂が関与する種々の疾患状態に対して、鎮静・睡眠薬、沈痛薬、血圧調節薬、血小板凝集抑制薬、循環器用薬、胃・腸の運動抑制薬、抗胃潰瘍薬、アレルギー治療薬、抗炎症薬、緑内障の予防・治療薬などとしての幅広い有用性が期待される。

このように、被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に、同物質のヒトCRTH2への作用（例えば、選択的なモジュレーター作用）を関連付けることにより、同物質のヒトプロスタグランジンD又はヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質を同定して、これを薬剤のスクリーニング等に用いて、産業上の多大な貢献をすることができる。

実施例

以下、実施例等により本発明を具体的に記載するが、この実施例により本発明の技術的範囲が限定して解釈されるべきものではない。

〔実施例1〕 ヒトCRTH2発現細胞の作成

ヒトCRTH2遺伝子発現プラスミドpRc/B19はNagata, K.ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 および再公表特許WO 97/46677に詳述さ

れた方法で作製した。なおヒトC R T H 2 c D N A全長を組み込んだ形質転換体が、B 1 9 c D N Aとして、工業技術院生命工学研究所に寄託番号F E R M P - 1 5 6 1 6として寄託されているので、寄託者の了解を得て使用することもできる。その場合B 1 9 c D N Aを制限酵素H i n d III およびX b a Iで消化し、プラスミドp R c / C M V (インビトロゲン社)のH i n d III / X b a Iサイトにサブクロニングすれば上述のp R c / B 1 9と同一の発現プラスミドが作製できる。このp R c / B 1 9および対照のプラスミドp R c / C M Vのそれぞれをヒト赤芽球系白血病細胞株であるK 5 6 2細胞にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、ゲネティシン (シグマ社) 4 0 0 μ g / ml存在下で2 - 3週間選択培養した。p R c / B 1 9を遺伝子導入したK 5 6 2細胞については、生き残った細胞をウエル当たり0. 3細胞で9 6穴マイクロプレートに蒔き2 - 3週間培養した。増殖してきた細胞クローンを抗ヒトC R T H 2抗体 (Nagata, K. ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999) で蛍光染色し、ヒトC R T H 2発現の高いクローンK B 8を得た。一方、対照のp R c / C M Vを遺伝子導入したK 5 6 2細胞はゲネティシンによる選択後、ポリクローンの状態で培養を維持した (以下、K 5 6 2 / n e oと称する)。

〔実施例2〕 比較対照のD Pレセプター発現細胞の作成

ヒトD Pレセプターc D N AはBoie, Y. ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995および特表平1 0 - 5 0 7 9 3 0に記載のヒトD Pレセプターc D N AのD N A塩基配列を基にR T - P C R法でクローニングした。すなわち、ヒトD Pレセプターの発現が高いことが知られているヒト小腸のpoly (A) + R N A (クローンテック社) を鋳型として、オリゴ (d T) プライマー (ファルマシア社) 及びM M L V逆転写酵素 (ファルマシア社) を用いてc D N Aを調製した。次に、制限酵素H i n d III サイトを含むフォワードプライマー (5' - C T T C C G A A G C T T T C A C T C C A G C C C T C T G C T C C C G : 配列番号1) およびX b a Iサイトを含みリバースプライマー (5' - G T T C T T T T C T A T A A A A T G T G A C A T A T T C C T C A G C T T A C C : 配列番号2) を用いてヒトD Pレセプターの翻訳領域をP C R (9 4 $^{\circ}$ C、1分; 6 8 $^{\circ}$ C、1分; 7 2 $^{\circ}$ C、1分の熱サイクルで3 5サイクル) で増幅した。得られたP C R産物を

H i n d III および X b a I で消化し、p R c / C M V の H i n d III / X b a I サイトにクローニングした。このようにして作製したヒト D P レセプターの発現プラスミドを実施例 1 で述べたと同様の方法で K 5 6 2 細胞に遺伝子導入し、ゲネティシンによる選択およびクローニング操作を行った。増殖してきた各クローンについて、後述する $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ 結合アッセイにより D P レセプター発現の高いクローン K D 3 6 を得た。

〔実施例 3〕 $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ 結合アッセイ

K B 8、K D 3 6 および K 5 6 2 / n e o それぞれの細胞を集め、 3×10^7 細胞/ml になるように Hank's balanced salt solution (H B S S、ギブコバイオールエル社) 中に再懸濁させ、その 0.1 ml を 0.5 ml マイクロチューブに分注し、氷上で冷やした。次に H B S S で希釈した 1 nM の $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ (アマシャム社) を加え、氷上で 1 時間反応させた。反応後の細胞を、1.5 ml のマイクロチューブに入れ予め氷冷しておいた 1 M 蔗糖および 10 % 牛胎児血清を添加した R P M I 1 6 4 0 培地 (1 ml) の上に穏やかに重層し、マイクロ遠心機で 10000 回転、3 分遠心した。0.1 ml ほど残して上清を吸引した後、再度、10000 回転で 1 分程遠心し、チューブ壁の反応液を全て落とし、細胞を吸わないように注意して上清をできるだけ取り除いた。細胞に結合した放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。200 倍濃度以上の非標識 PGD_2 存在下に同様に測定した時の放射活性を非特異的結合とした。その結果、第 1 図に示すように、K-5 6 2 / n e o には特異的な $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ の結合は認められなかった。一方、K B 8、K D 3 6 ではいずれも $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ の特異的な結合が認められた。またこの測定系において、抗 C R T H 2 抗体 B M 7 (Nagata, K. ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 および Nagata, K., ら) は濃度依存的に、K B 8 に対する $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ の結合だけを選択的に阻害した。この方法で D P レセプターに作用しないヒト C R T H 2 選択的なモジュレーターを同定できることが示された。

〔実施例 4〕 細胞内カルシウムアッセイ

K B 8、K D 3.6 および K 5 6 2 / n e o それぞれの細胞を集め、10 % 牛胎児血清添加 R P M I 1 6 4 0 培地中に 5×10^6 細胞/ml になるように懸濁させ、

5 μ M Fura-2 AM (ドージンドー社) 存在下で 37℃、1 時間培養した。培養後、細胞を HBSS で 3 回遠心洗浄しフリーの Fura-2 AM を除いた。次に、細胞を 0.1% 牛血清アルブミンを含む HBSS 中に 10^6 細胞/ml になるように再懸濁し、内容量 0.4 ml の石英セルに入れ、パーキンエルマー分光光度計 LS 50 B にセットした。サンプル添加後の、励起波長 340 nm および 380 nm における蛍光強度 (510 nm) の比の経時的な変化を FL-Winlab ソフトウェア (パーキンエルマー) で計算して求めた。K562/neo は 0.25–250 nM の PGD₂ に対して有意な細胞内カルシウム濃度の変動は示さなかった。一方、KB8 および KD36 ではいずれも数 nM の PGD₂ 処理により顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇が誘導された。この測定系においても抗 CRTH2 抗体 BM7 はヒト CRTH2 選択的なアンタゴニスト活性を示した (第 2 図)。この方法でも DP レセプターに作用しないヒト CRTH2 選択的なモジュレーターを同定できることが示された。

〔実施例 5〕 ヒト CRTH2 に対する種々のプロスタノイドの結合活性

実施例 3 で示した [³H] PGD₂ 結合アッセイを種々の非標識プロスタノイド (いずれもケイマン社) 存在下に実施し、ヒト CRTH2 の各種プロスタノイドに対する結合親和性を評価した。その結果、ヒト CRTH2 に対する結合親和性の強さの順位は PGD₂ \geq 13, 14-デヒドロ-15-ケト PGD₂ >> プロスタグランジン J₂ (PGJ₂) > 15-デオキシデルタ 12, 14-PGJ₂ \geq プロスタグランジン E₂ (PGE₂) = プロスタグランジン A₂ (PGA₂) >> トロンボキサン B₂ (TXB₂) であった (第 3 図)。比較対照にした DP レセプターに対する結合親和性の強さの順位は PGD₂ = PGJ₂ >> PGE₂ > 13, 14-デヒドロ-15-ケト PGD₂ > 15-デオキシデルタ 12, 14-PGJ₂ \geq TXB₂ \geq PGA₂ であった。ヒト CRTH2 と DP レセプターの PGD₂ に対する結合親和性の強さは同等であったが、他のプロスタノイドに対する結合親和性では 13, 14-デヒドロ-15-ケト PGD₂ のように大きな違いがあることが明らかになった。

〔実施例 6〕 選択的アゴニストによるヒト CRTH2 分子のダウンモジュレーション

KB 8細胞を、10%牛胎児血清添加RPMI 1640培地に、 10^6 細胞/mLとなるように懸濁させ、種々の被験サンプル存在下において、37℃で1時間培養した。培養後、細胞をHBSSで2回遠心洗浄し、フリーのサンプルを除いた。次に、細胞を、0.5%牛血清アルブミンおよび0.05%NaN₃を添加したHBSSに再懸濁し、抗CRTH2モノクローナル抗体BM16およびフィコエリスリン標識抗ラットイムノグロブリン抗体を用いて蛍光染色した。蛍光染色した細胞の平均蛍光強度をフローサイトメーター（ベクトンディッキンソン製）で測定し、サンプルを処理した細胞の値を、無処理（コントロール）の細胞の値と比較した。その結果を、第4図に示す。

第4図に示すように、選択的アゴニストであるPGD₂および13, 14-デヒドロ-15-ケートPGD₂では、コントロールに比べて有意にCRTH2のダウンモジュレーションを誘導したが、アゴニスト活性のないPGE₂では、そのような効果は観察されなかった。すなわち、この方法により、CRTH2選択的なアゴニストを同定できることが示された。

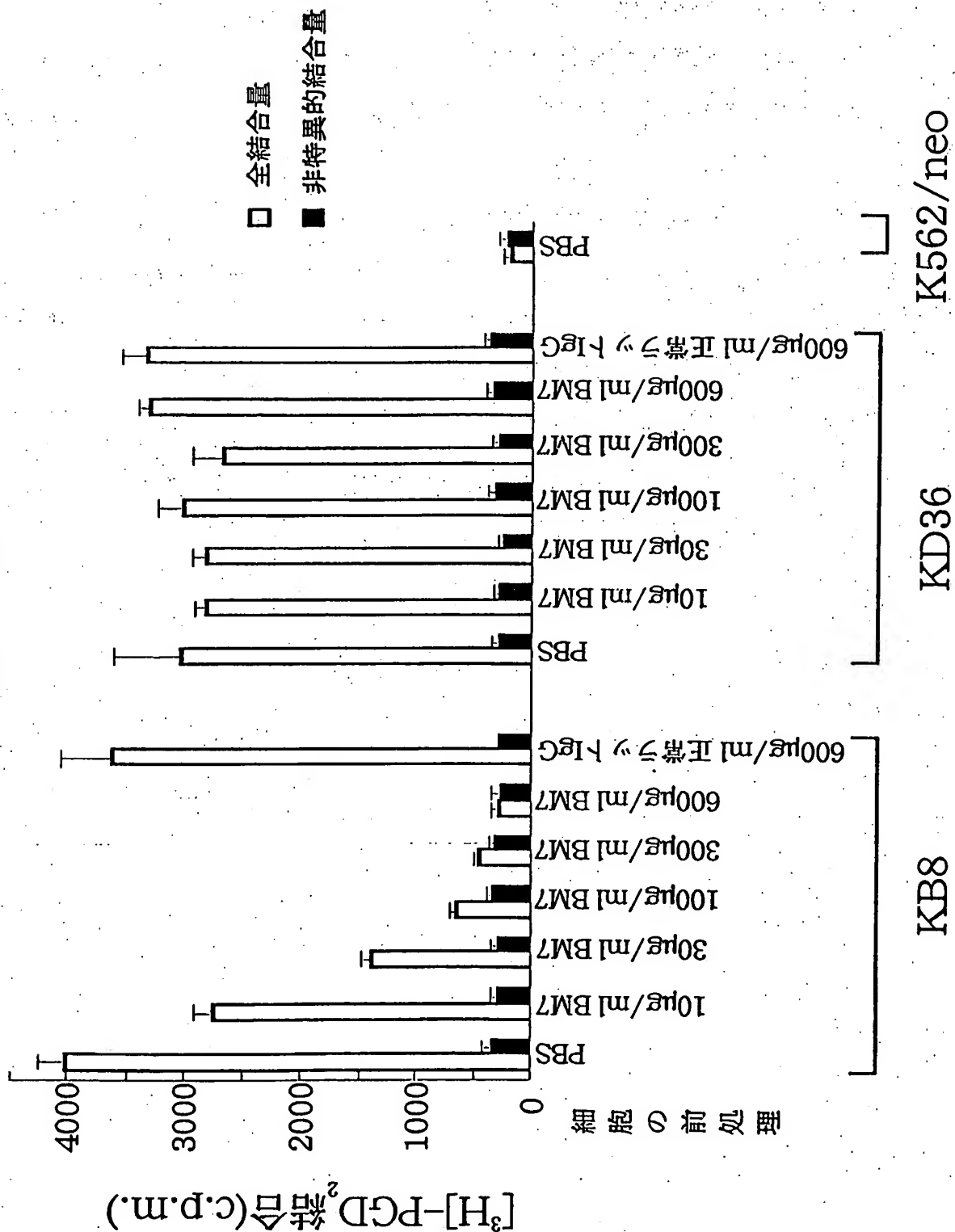
産業上の利用可能性

以上のように、本発明により、Dプレセプター以外の、第2のヒトPGD₂受容体サブタイプを見出され、種々の疾患の治療や予防に有用な、この第2のPGD₂受容体サブタイプに対して作用する物質、例えば、選択的なモジュレーター（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）の同定法が提供される。

請求の範囲

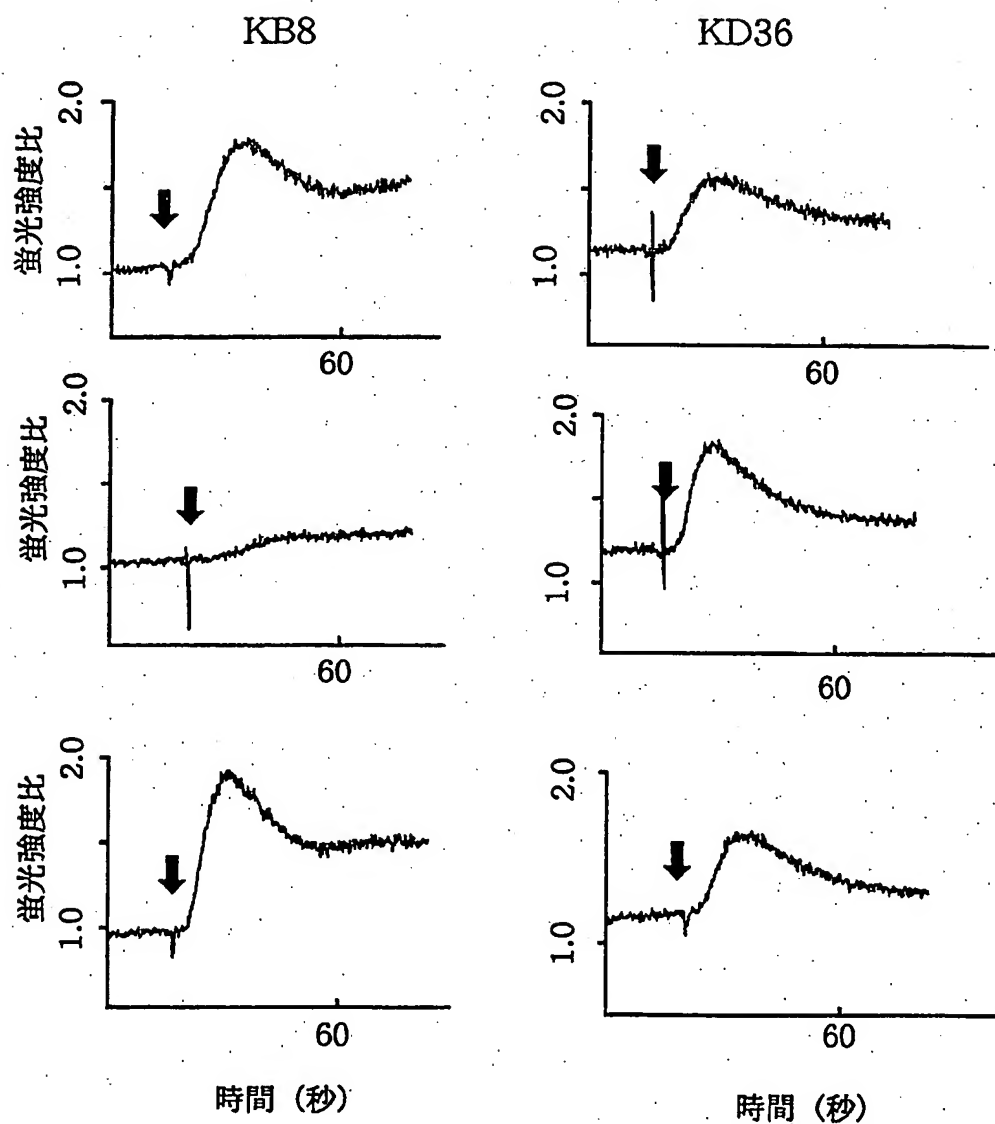
1. 被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に、同物質のヒトC R T H 2 への作用を関連付けることにより、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質を同定する、同定方法。
2. 被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する作用が、ヒトプロスタグランジンD受容体サブタイプにおいて選択的なモジュレーター作用である、請求の範囲第1項記載の同定方法。
3. 被験物質における、ヒトC R T H 2 若しくはその誘導体に対する結合性を、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質の指標とする、請求の範囲第1項又は第2項記載の同定方法。
4. 被験物質における、in situ の状態のヒトC R T H に対する作動性を、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質の指標とする、請求の範囲第1項又は第2項記載の同定方法。

第1図

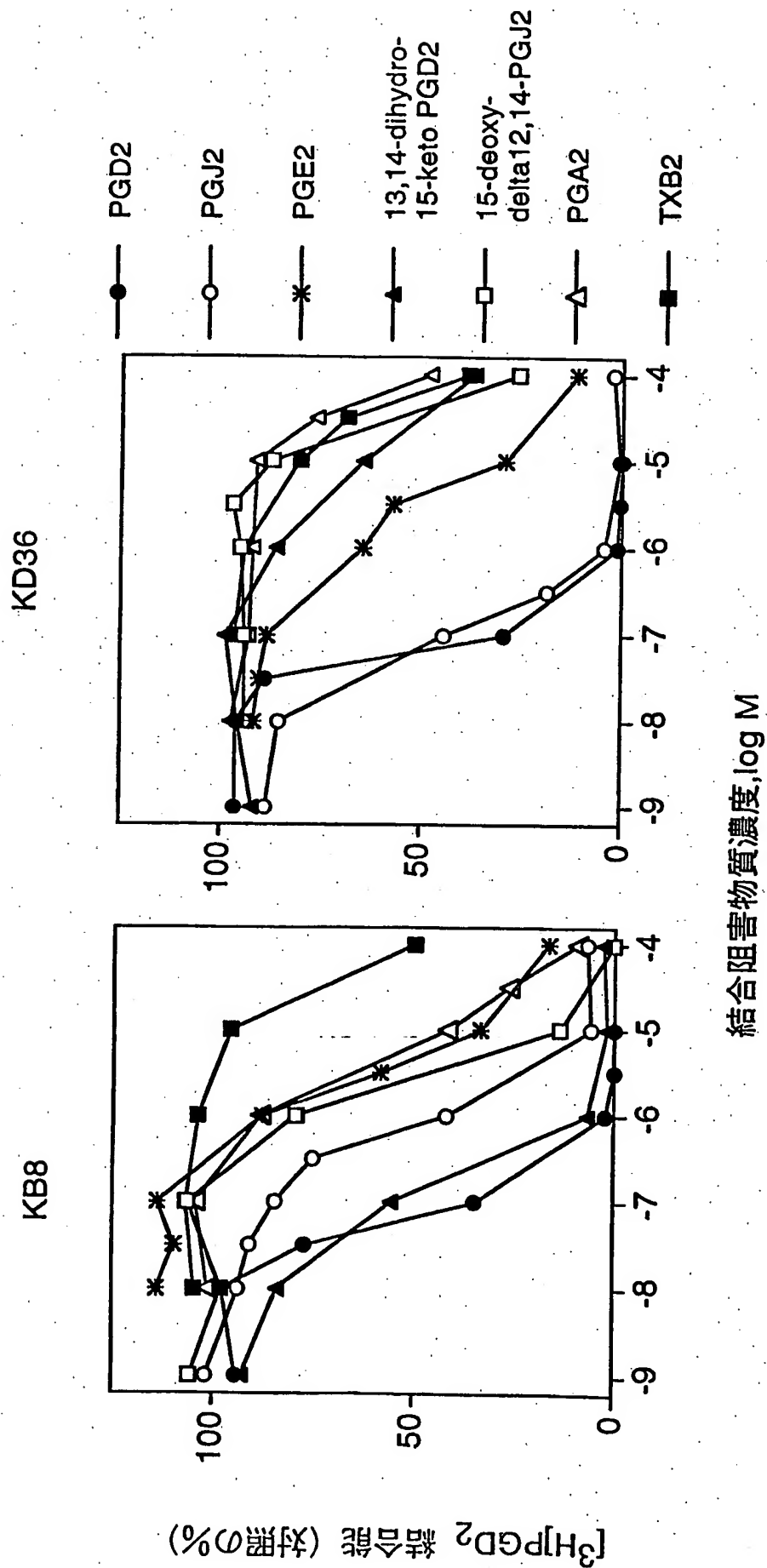


第 2 図

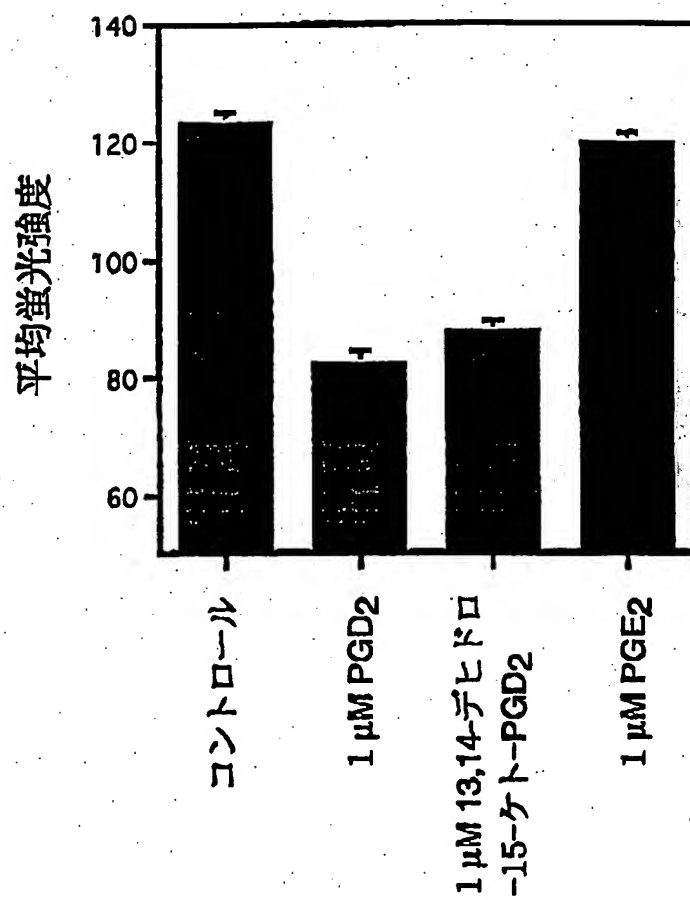
細胞の前処理

PBS
室温 20 分BM7
500 μ g/ml
室温 20 分正常ラット
IgG
500 μ g/ml
室温 20 分* ↓ で終濃度25nM PGD₂を反応液中加入した。

第 3 図



第 4 図



SEQUENCE LISTING

<110> BML, INC.

<120> Method of identifying property of substance against
human prostaglandin D receptor

<130> PBM42

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Hominidae

<400> 1

cttccgaagc ttctactcca gccctctgct cccg

34

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Hominidae

<400> 2

gttcttttct ataaaatgtg acatattcct cagcttacc

39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | WO, 97/46677, A (BML, Inc.), 11 December, 1997 (11.12.97) & US, 6040426, A | 1-4 |
| A | Nagata et al., "Selective Expression of a Novel Surface Molecule by Human Th2 Cells In Vivo", J. Immunol., Vol.162, pp.1278-1286 (Feb.1999) | 1-4 |
| P,A | BIOSIS No.199900523261 & FEBS Letters, Vol.459, No.2, pp.195-199 (Oct.1999) | 1-4 |
| A | BIOSIS No.199900124875 & Gene, Vol.227, No.1, pp.71-77 (Feb.1999) | 1-4 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 October, 2000 (04.10.00)

Date of mailing of the international search report
17 October, 2000 (17.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05615

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/566, G01N 33/50, G01N 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | WO, 97/46677, A (株式会社ビー・エム・エル) 11. 12月. 1997 (11. 12. 97) & US, 6040426, A | 1-4 |
| A | Nagata et al. 「Selective Expression of a Novel Surface Molecule by Human Th2 Cells In Vivo」 J. Immunol., Vol. 162, P. 1278-1286 (Feb. 1999) | 1-4 |
| P, A | BIOSIS No. 199900523261 & FEBS Letters, Vol. 459, No. 2, P. 195-199 (Oct. 1999) | 1-4 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.10.00

国際調査報告の発送日

17.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

2J

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | BIOSIS No. 199900124875 & Gene, Vol. 227, No. 1, P. 71-77 (Feb. 1999) | 1 - 4 |